

Lipoproteína de alta densidad como vehículo de entrega selectiva de fármacos en el tratamiento de la aterosclerosis.

Pedro Luis Echevarria Torres^{1, 2, a}, Aurora Bernal Mera², Carlos Pérez Medina²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de Nanomedicina e Imagen Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, 28029 Madrid, España.

a. pedroluis6194@gmail.com

Palabras clave: aterosclerosis; HDL; apolipoproteína A-I; simvastatina; macrófagos

Resumen

La aterosclerosis es un desorden inflamatorio sistémico que subyace a la enfermedad cardiovascular. La deposición de lípidos y la infiltración de células del sistema inmune provocan el desarrollo de la placa aterosclerótica, cuya eventual ruptura puede causar potencialmente aterotrombosis y consecuentes eventos cardiovasculares agudos. Por otra parte, la nanoterapia tiene un elevado potencial para promover la resolución de procesos inflamatorios, permitiendo la entrega selectiva de fármacos en el sitio de inflamación. El presente trabajo aborda la evaluación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) como vehículo para la entrega selectiva de fármacos en el tratamiento para la aterosclerosis. Concretamente, se estudió la formulación y caracterización fisicoquímica, así como su evaluación *in vitro* e *in vivo*, de nanopartículas de HDL cargadas con simvastatina (S-HDL), empleada aquí como fármaco modelo con propiedades antiinflamatorias pero de limitada eficacia por vía oral. La obtención de las nanopartículas de HDL comprendió desde la purificación de apolipoproteína A-I de HDL de plasma humano, con un alto rendimiento y pureza, hasta su formulación. Las S-HDL encapsularon un 73% de la simvastatina adicionada. Por otra parte, las S-HDL mostraron un tamaño mayor que las HDL reconstituidas sin fármaco, sin diferencias significativas en el índice de dispersidad. Además, las S-HDL se unen *in vitro* a los macrófagos derivados de médula ósea, siendo mayor este reconocimiento a concentraciones de 10 μM de nanopartículas. *In vivo*, las nanopartículas también muestran selectividad de reconocimiento por esta población celular, así como por otras células mieloides como células dendríticas y monocitos.

Cita: Echevarria Torres, Pedro Luis; Bernal Mera, Aurora; Pérez Medina, Carlos (2020) Lipoproteína de alta densidad como vehículo de entrega selectiva de fármacos en el tratamiento de la aterosclerosis. *dianas* 9 (2): e202009fa05. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202009fa05 <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa05>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Echevarria-Torres PL, Bernal-Mera A, Pérez-Medina C. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La aterosclerosis es un desorden inflamatorio crónico, caracterizado por la deposición focal y asimétrica de material lipídico y tejido fibroso en la pared de las arterias de mediano y gran tamaño [1]. Esta enfermedad constituye la base patológica de enfermedades cardiovasculares que afectan seriamente la salud humana [2], entre los que se incluyen enfermedad de la arteria coronaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica [3]. La evolución de la aterosclerosis se produce por la interacción compleja de diferentes procesos tales como disfunción endotelial, deposición extensa de lípidos en la íntima, respuestas inmunes innatas y adaptativas exacerbadas, formación de células espumosas, proliferación de las células musculares lisas y remodelación de la matriz extracelular, dando como resultado la formación de lesiones ateroscleróticas, comúnmente conocidas como placas de ateroma [4]. Entre los factores de riesgo de aterosclerosis se encuentran la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial, el tabaquismo, la edad, la obesidad, la diabetes mellitus y el alcoholismo [5].

La formación de la placa aterosclerótica se ve desencadenada por la exposición del endotelio a agentes tales como lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *Low-Density Lipoprotein*) oxidadas, radicales libres, la elevación de homocisteína plasmática derivada de problemas metabólicos, así como infección sistémica crónica por diferentes virus [6]. Las LDL oxidadas sobresalen entre los principales factores que desencadenan la enfermedad [7]. La acumulación de partículas de LDL estimula la modificación de estas LDL en el endotelio [8] y la producción de moléculas proinflamatorias, favoreciendo la llegada de monocitos y linfocitos a la pared arterial [9]. Los monocitos que migran a las zonas de lesión se diferencian a macrófagos ($\text{M}\Phi$) bajo la influencia del factor estimulador de colonias [10]. Los $\text{M}\Phi$ activados fagocitan a las LDL modificadas de forma no regulada mediante varios mecanismos que conllevan una acumulación masiva de colesterol en el citoplasma, para finalmente formar las células espumosas que caracterizan esta patología [11].

Por otra parte, la progresión de la aterosclerosis se caracteriza por la instauración de un conjunto de reacciones inmunes en la pared arterial [12] en las que participan los linfocitos tanto T como B, como otras células del sistema inmune, tales como células dendríticas y mastocitos, conduciendo a lesiones ateroscleróticas avanzadas [13]. La existencia de estas células en la placa aterosclerótica propicia la presencia de citoquinas que participan en diferentes etapas del proceso inflamatorio [13]. La existencia de estas interacciones complejas conduce a tasas de progresión impredecibles y a una morfología heterogénea de la placa de ateroma [14]. Las placas en estados avanzados presentan un gran núcleo necrótico acelular rico en lípidos, con una capa fibrosa delgada superpuesta, infiltrada por células inflamatorias y calcificación difusa. Factores biomecánicos, hemodinámicos y físicos contribuyen a la desestabilización de la placa, provocando la ruptura de la capa fibrosa [4] con la consecuente formación de trombos que provocan infartos de miocardio. [15]

En este sentido, estudios preclínicos y clínicos han aportado hallazgos de la existencia del proceso de regresión de la placa aterosclerótica [16]. Las estatinas, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa, poseen efectos pleiotrópicos que promueven cambios en la composición de las lesiones, permitiendo la estabilización y regresión de la placa y reducción de la estenosis [17]. Estudios en conejos con lesiones ateroscleróticas avanzadas mostraron que el tratamiento con simvastatina (Sim), uno de los compuestos de la familia de las estatinas, provocó un efecto anti-aterosclerótico sin disminuir significativamente la concentración de lípidos circulantes [18]. Además, tratamientos en pacientes obesos con simvastatina provocaron un poderoso efecto antiinflamatorio y reducción de la expresión de mediadores proinflamatorios [19]. Sin embargo, a pesar de sus efectos beneficiosos, la eficacia de las estatinas se limita a un 30-40% de los casos tratados [20], influyendo en el caso de la simvastatina su baja biodisponibilidad al ser administrada por vía oral [21]. De ahí la necesidad de buscar alternativas que aumenten la efectividad de las estatinas en el proceso de regresión de la placa aterosclerótica.

El empleo hoy en día de la nanoterapia tiene un elevado potencial para promover la resolución de procesos inflamatorios [22], ya que permite la entrega selectiva de fármacos en el sitio de inflamación, lo que disminuye la dosis administrada y reduce los efectos secundarios [23]. Sin embargo, comparativamente, pocas formulaciones se trasladan clínicamente para beneficio de los pacientes [24]. Aun así, la posibilidad de contar con compuestos que modulan la función de los macrófagos presentes en lesiones ateroscleróticas y la necesidad de contar con una estrategia de entrega dirigida a estos, hace de la nanomedicina una variante para el tratamiento de la aterosclerosis [25].

En la actualidad se ha definido que las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High-Density Lipoprotein*) tienen propiedades protectoras contra la aterosclerosis [26]. Las HDL son nanopartículas naturales compuestas principalmente por fosfolípidos y apolipoproteína A-I (apo A-I) y están involucradas en el proceso de transporte del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para su posterior excreción [27]. Esta propiedad demuestra el efecto ateroprotector de las HDL, atribuido a promover el flujo de colesterol desde los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, que está mediado por la presencia de receptores de membrana en macrófagos a los cuales se unen apo A-I y las HDL [28]. Estas propiedades de las HDL han sido explotadas con fines de diagnóstico y terapéuticos en cáncer y enfermedades cardiovasculares, teniendo en cuenta que son biocompatibles, cruzan eficientemente diferentes barreras biológicas e intrínsecamente interactúan con células del sistema inmune [29]. La incorporación de diferentes etiquetas anfífilas, incluyendo radioisótopos quelados [29, 30] o lípidos paramagnéticos y fluorescentes, hacen de las HDL una importante herramienta para su uso en imagen molecular [29]. Además, se ha visto que la nanoingeniería ha permitido la reconstitución de las HDL con drogas hidrófobas o polímeros de liberación controlada para propósitos terapéuticos [31].

Sobre la base de los antecedentes expuestos, el presente proyecto tiene como objetivo global la evaluación de las HDL como vehículo para entrega selectiva de fármacos para el potencial tratamiento de la aterosclerosis. Usando HDL cargado con simvastatina (S-HDL) como modelo, se fijaron como objetivos específicos la purificación y caracterización de apolipoproteína A-I de HDL humano, la formulación de S-HDL, la purificación y caracterización de Sim de S-HDL, así como la determinación de tamaño de partículas y dispersidad de HDL, con y sin simvastatina. Además, la evaluación del reconocimiento de HDL cargadas con simvastatina en la superficie de macrófagos derivados de médula ósea, así como la especificidad de reconocimiento *in vivo* de S-HDL por poblaciones celulares de médula ósea.

Materiales y Métodos

Purificación de Apolipoproteína A-I de HDL de plasma humano

La producción de apo A-I de alta pureza se realizó a partir de HDL de plasma humano obtenido de Bioresearch Technology Inc., Estados Unidos (HDL crudo). Para ello, se diluyeron 2 g de HDL crudo en relación 1:100 (m:v) en solución de KBr, manteniendo el valor de densidad en la solución final entre 1,22 g/mL- 1,24 g/mL, adicionando KBr sólido. Las HDL se purificaron por centrifugación a 138000 g por 48 horas a 4 °C en ultracentrífuga Optima™ L-100 XP (Beckman Coulter, Estados Unidos), obteniéndose un

gel de HDL pura, el cual se disolvió homogéneamente en agua ultrapura (240 mL de H₂O/g de gel de HDL). Las HDL diluidas se adicionaron a solución de cloroformo/metanol 1:1 (v:v) frío con un flujo de 0,4 mL/minutos y se centrifugaron a 300 g en centrifuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Alemania) durante 5 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de cloroformo/metanol 2:1 (v:v) durante 20 minutos en baño de ultrasonidos Precisdig (J.P. Selecta S.A, España) y la suspensión resultante se filtró a vacío en embudo Büchner durante toda la noche en campana extractora (Flores Valles S.A, España), logrando un completo secado de la proteína. El polvo resultante se renaturalizó con una disolución de cloruro de guanidinio (GndCl) de concentración 6 N (150 mL de GndCl/g de proteína en polvo) y se filtró la solución en filtro de membrana polietersulfona de 0,22 µm (Thermo Scientific, Reino Unido). La solución de apo A-I en GndCl filtrada se puso a dializar en casetes de 10 kDa de membrana (Thermo Scientific, Reino Unido) en tampón de diálisis (4000 mL de H₂O desmineralizada, 100 mL de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*) 10X, pH 7,4; 2,34 g NaCl), durante 4 días a 4 °C. La solución dializada se centrifugó a 5000 g durante 30 minutos en centrifuga MIKRO 120 y el sobrenadante se filtró en filtro de membrana polietersulfona de 0,22 µm (Thermo Scientific, Reino Unido).

Análisis de pureza de Apolipoproteína A-I por cromatografía de exclusión molecular

La solución de apo A-I purificada se pasó por una columna de exclusión molecular Superose™ 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Suecia) empleando un equipo de cromatografía Jasco L4000 (Jasco, España) equipado con un detector de diodos Jasco MD-4010 (Jasco, España). La carrera se realizó en un tiempo de 40 minutos a un flujo de 0,75 mL/minutos y la detección se realizó a 220 nm. El tampón de carrera empleado fue: PBS 1X.

Determinación de concentración de Apolipoproteína A-I por Método de Bradford

La concentración de apo A-I purificada se determinó empleando el método de Bradford [32]. Para ello se empleó una curva patrón de apo A-I comercial con un 95 % de pureza (Athens Research & Technology, Estados Unidos). Para la curva patrón se preparó un *stock* de concentraciones de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg/mL de apo A-I en PBS 1X. Se tomaron 50 µL por duplicado del stock preparado para la curva patrón y de la solución de apo A-I purificada en dilución 1:2 en PBS IX, previamente concentrada hasta 1 ml en Vivaspín turbo 15 de 10 kDa (Sartorius, España) a 4000 g durante 2 horas en centrifuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Alemania), y se añadió a cada uno 1 mL de reactivo de Bradford (Thermo Scientific, Estados Unidos), se homogenizó cada mezcla y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos. Se tomaron 100 µL de cada mezcla que se colocaron en placa de 96 pozos (Corning Inc., Estados Unidos) y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas xMark™ (Bio-Rad, Estados Unidos). La concentración se calculó a partir de la relación lineal entre la concentración de apo A-I y el valor de absorbancia a 595 nm.

Análisis de pureza de Apolipoproteína A-I por electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) al 12 % (Bio-Rad, Estados Unidos) según el método de Laemmli [33]. Se emplearon apo A-I comercial con un 95% de pureza (Athens Research & Technology, Estados Unidos) y albúmina con un 98 % de pureza (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como controles positivo y negativo respectivamente. El tampón de carrera empleado fue una solución de Tris 0,25 M, glicina 1,92 M, 1% (m/v) SDS, pH 8,3 (Bio-Rad, Estados Unidos). La carrera se realizó en condiciones reductoras y no reductoras, aplicando 10 µL de la proteína purificada y los controles en tampón Laemmli 2x (Bio-Rad, Estados Unidos) en presencia o no de β-mercaptoetanol al 5 %. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en tampón reductor y se realizó la carrera a voltaje constante (150 V) durante una hora. Para la detección de la proteína en los geles se realizó una tinción con azul de Coomassie, para incrementar la sensibilidad del revelado.

Obtención de las HDL

Para la obtención de las nanopartículas HDL se emplearon los lípidos 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) y 1-miristoil-2-hidroxy-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC) obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc., Estados Unidos. Las HDL fueron preparadas teniendo en cuenta una relación molar 2,5:1 (DMPC:apo A-I) para aquellas que no contenían simvastatina (HDL reconstituido, rHDL), una relación 10:1:1:1,8 (DMPC:MHPC:apo A-I:Sim) para aquellas que si la incluían (S-HDL) y una relación 10:1:1:1,8:0,15 (DMPC:MHPC:apo A-I:Sim:DiR) para las S-HDL marcadas con el fluoróforo ,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR) (AAT Bioquest, Estados Unidos) (DiR-S-HDL). Se prepararon soluciones clorofórmicas de DMPC para las rHDL y soluciones metanol:cloroformo de DMPC:MHPC con Simvastatina para las S-HDL y las DiR-S-HDL, estas últimas incluyendo además DiR, y se evaporaron a presión reducida usando un evaporador rotatorio IKA XXX equipado con bomba de vacío Welch XXX (Gardner Denver, Alemania) y la película se mantuvo al vacío

durante 30 minutos para garantizar la completa evaporación del solvente orgánico. Los lípidos se rehidrataron con el volumen necesario de disolución de apo A-I purificada y PBS 1X hasta completar un volumen de 16 mL, y se homogenizó la mezcla durante 1 minuto en baño de ultrasonido Precisdig (J.P. Selecta S.A, España) y 30 minutos en baño de agua HB D S099 (IKA®, Alemania) a 37 °C. Las suspensiones resultantes se sometieron a ciclos de ultrasonido en un equipo UW 2070 (Bandelin electronic, Alemania), dotado de una sonda de titanio, durante 3 horas, con una amplitud de señal de 65 %, a 4 °C hasta obtener HDL del tamaño deseado. Las soluciones se concentraron en un Vivaspin turbo 4 de 10 kDa (Sartorius, España) a 4000 g durante 3 horas en centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Alemania) y se separaron los agregados de gran tamaño con centrifugación a 4000 g durante 5 minutos a 4 °C en centrífuga MIKRO 120 (Hettich Zentrifugen, Alemania), seguido de filtración del sobrenadante en filtros de membrana polietersulfona de 0,22 µL (Thermo Scientific, China).

Extracción de simvastatina de las muestras de S-HDL

La simvastatina se extrajo de las formulaciones S-HDL preparadas previamente, para analizar su concentración en las HDL. Para ello se diluyó la solución de HDL en Acetonitrilo 1:20 (v:v) y se mantuvo la mezcla en baño de ultrasonidos Precisdig (J.P. Selecta S.A, España) durante 20 minutos. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 4000 g en centrífuga MIKRO 120 (Hettich Zentrifugen, Alemania), tomando el sobrenadante resultado de esta centrifugación para su posterior análisis.

Determinación de concentración y porcentaje de recobrado de Simvastatina por cromatografía líquida de alta eficacia

La concentración de Simvastatina purificada de las S-HDL se determinó empleando una curva patrón de Simvastatina comercial (Acros Organics, China) con un 98% de pureza obtenida por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Se preparó un *stock* de concentraciones de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 mg/mL de simvastatina en Acetonitrilo. Se pasaron 10 µL de cada una de las soluciones con las diferentes concentraciones de simvastatina comercial por duplicado por una columna Fortis C18 (Fortis Technologies Ltd., Reino Unido) con una fase móvil Acetonitrilo:H₂O ultrapura 90:10 (v:v) a un flujo de 1.0 mL/minutos empleando un equipo de cromatografía Jasco L4000 (Jasco, España) equipado con un detector de diodos Jasco MD-4010 (Jasco, España). La carrera se realizó en un tiempo de 6 minutos y se realizó la detección a 230 nm. La solución de simvastatina purificada de las HDL se pasó por la misma columna en iguales condiciones que la simvastatina comercial. La concentración se calculó a partir de la relación lineal entre la concentración de simvastatina y el área bajo la curva del pico de elución en el cromatograma. El porcentaje de recobrado se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobrado Sim} = [(masa \text{ Sim purificada}) / (masa \text{ Sim inicial adicionada en S-HDL})] \times 100$$

Caracterización físico-química de las HDL

El diámetro medio y el índice de dispersidad (*D*) de las preparaciones de HDL cargadas y no cargadas con simvastatina se determinaron mediante dispersión de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*). Para ello, la suspensión de las HDL se diluyó 1:20 (v:v) en PBS 1X, filtrado a través de filtros de 0,22 µm (Thermo Scientific, Reino Unido) (volumen final 1 mL) y se empleó un analizador de partículas Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido).

Evaluación de reconocimiento de DiR-S-HDL a macrófagos por citometría de flujo

Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM, del inglés *Bone Marrow-Derived Macrophages*) se obtuvieron de un ratón hembra apo E-KO de 14 semanas de edad en dieta normal, el cual se sacrificó y se le extrajeron las células de médula de fémur y tibia. Para ello se pasaron 10 mL de medio RPMI (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) al 10 % de suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) por el interior de los huesos empleando aguja de 24 G y jeringuilla. Las células obtenidas se centrifugaron 453 g a 5 minutos en centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Alemania) y se mantuvieron durante 7 días en medio de diferenciación a macrófagos (RPMI, 10 % de FBS, 1 % penicilina/estreptomicina (5000 unidades/mL de penicilina and 5000 µg/mL de estreptomicina) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), 30 % medio de células L929 (banco de trabajo), pH=7,2) en placas p100 (VWR International, Estados Unidos) a 37 °C en atmósfera al 5 % de CO₂. Cuando las células alcanzaron la confluencia se desprendieron empleando PBS1X-EDTA 5mM y se sembraron 1 millón de células por pocillo en placas de 6 pozos (Corning Inc. Estados Unidos). Para el conteo de las células viables se empleó una cámara de Neubauer (Thomas Scientific, EUA) y el método del colorante no vital tripán azul [34]. Las células posteriormente fueron tratadas durante 14 horas a 37 °C en atmósfera al 5 % de CO₂ con 0,1 µM, 1 µM y 10 µM de DiR-S-HDL por separado, además se empleó un control negativo de reconocimiento de células que no recibieron tratamiento. Las células fueron desprendidas empleando PBS1X-EDTA 5 mM y se mantuvieron en PBS1X-FBS2%. Las células se analizaron en un citómetro de flujo BD LSR FORTRESSA X-20 (BD Biosciences, Estados Unidos).

Evaluación de reconocimiento de DiR-S-HDL a poblaciones celulares en médula ósea por citometría de flujo

El reconocimiento de las S-HDL a poblaciones celulares en médula ósea se evaluó en un ratón hembra apo E-KO de 14 semanas de edad en dieta normal. Para ello se administraron 0,5 mg de DiR-S-HDL por Kg del animal por vía intravenosa y el ratón fue sacrificado 24 horas después de la administración. Se empleó un ratón como control negativo de reconocimiento que no recibió tratamiento. Las tibias, húmeros y fémures de cada animal se trituraron con mortero de cerámica en presencia de 10 mL de PBS 1X, y se filtró la mezcla en filtro de membrana polietersulfona de 0,40 μm (Thermo Scientific, Reino Unido). La solución resultante se centrifugó 453 g durante 7 minutos a 4 °C en centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Alemania) desechando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 2 mL de tampón de lisis (8,29 g de NH_4Cl , 1 g de KHCO_3 , 0,038 g de ácido etilendiaminotetraacético disódico, pH 7,4) y se mantuvo en presencia de este 12 minutos a 4 °C. Se adicionaron 18 mL de PBS1X-2%FBS y se centrifugaron las células 453 g durante 7 minutos a 4 °C en centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Alemania). Las células se mantuvieron durante 30 minutos a 4 °C en presencia de 150 μL de solución de tinción PBS1X-2%FBS:Anticuerpos (1:100) (v:v). Los anticuerpos evaluados fueron: Biotin anti-mouse CD49b, Biotin anti-mouse NK-1.1, Biotin anti-mouse CD90, Biotin anti-mouse/human CD45R/B220, Biotin anti-mouse Ly-6G, Biotin anti-mouse TER-119, APC anti-mouse/human CD11b, PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD11c, PE/Cy7 anti-mouse F4/80, todos proporcionados por BioLegend, Estados Unidos, FITC Rat Anti-Mouse Ly-6C (BD Pharmingen, Alemania). La tinción se detiene adicionando 4 mL PBS1X-2%FBS y posteriormente se centrifugan las muestras 453 g durante 7 minutos a 4 °C en centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Alemania). Seguidamente se mantuvieron las células en 150 μL de PBS1X-2%FBS: PE Streptavidin (BioLegend, Estados Unidos) (1:100) (v:v) durante 15 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con PBS1X-2%FBS como se ha descrito previamente y se les adicionó 150 μL de PBS1X-2%FBS: 4', 6-diamidino2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (1:100) (v:v). Las células se analizaron en un citómetro de flujo BD LSR FORTESSA X-20 (BD Biosciences, Estados Unidos).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 23.0. La comprobación de la normalidad se realizó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, seguido de la prueba de Levene para evaluar homogeneidad de varianza. Los datos analizados cumplieron una distribución normal y homogeneidad de varianza por lo que se les aplicó una prueba t de Student al tratarse de comparar sólo 2 grupos de datos. La diferencia fue considerada estadísticamente significativa con $*P < 0.05$. Los resultados se mostraron como media \pm desviación estándar (DE).

Resultados

Purificación y Caracterización de Apolipoproteína A-I de HDL de plasma humano

La purificación de apo A-I se llevó a cabo a partir de HDL de plasma humano como fuente natural de esta proteína. El proceso de purificación se caracterizó por la deslipidación de las nanopartículas de HDL con solventes orgánicos conduciendo a la precipitación de apo A-I, seguido de la renaturalización y diálisis de la proteína contra un tampón específico produciendo apo A-I con un alto porcentaje de pureza (figura 1).

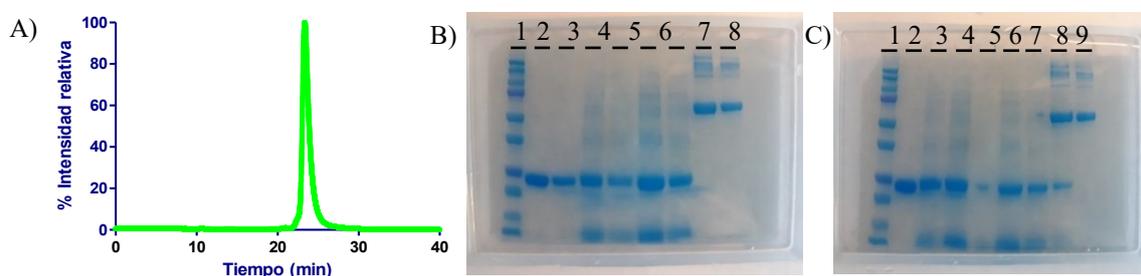


Figura 1. Evaluación de la pureza de apo A-I extraída de HDL de plasma humano. A) Perfil cromatográfico de apo A-I purificada obtenido por cromatografía de exclusión molecular. B) Análisis mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol de apo A-I purificada. C) Análisis mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras de apo A-I purificada. Cada carril corresponde a las muestras: 1: patrón de Peso Molecular; 2: apo A-I comercial; 3: apo A-I comercial dilución 1:2 en PBS 1X; 4: apo A-I lote 1; 5: apo A-I lote 1 dilución 1:2 en PBS 1X; 6: apo A-I lote 2; 7: apo A-I lote 2 dilución 1:2 en PBS 1X; 8: albúmina comercial; 9: albúmina comercial dilución 1:2 en PBS 1X.

Como se puede observar la aparición de un único pico a los 23,5 minutos en el cromatograma de exclusión molecular al analizar la solución de la proteína purificada determina un elevado valor en la

pureza de la proteína purificada (figura 1 A). Por otra parte, en la electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras se puede observar que la solución purificada, posee mayoritariamente apo A-I al observarse una banda más intensa correspondiente a una masa de 28 kDa (peso molecular de apo A-I) en cada uno de los carriles de las soluciones purificadas de los diferentes lotes (carriles 4-7).

Además, como parte de la caracterización de la proteína apo A-I purificada se determinó su concentración por método de Bradford. Para ello se midió la absorbancia a 280 nm de las muestras, siguiendo los pasos descritos en el acápite de materiales y métodos. Se obtuvo un total de 3,1 mg/mL y 3,7 mg/mL de apo A-I para los lotes 1 y 2 respectivamente.

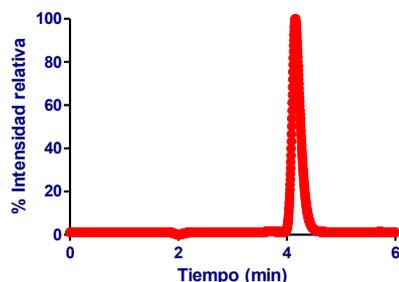


Figura 2. Evaluación de la concentración de Simvastatina en formulaciones de S-HDL. Se muestra el perfil cromatográfico de Simvastatina obtenido por HPLC.

Extracción y cuantificación de Simvastatina en formulaciones de S-HDL

Con el objetivo de analizar la cantidad de simvastatina encapsulada en las nanopartículas de HDL extraímos la simvastatina de las S-HDL preparadas previamente. Para ello se realizó la ruptura con solventes orgánicos de la estructura de las HDL seguido de procesos de centrifugación, obteniendo Simvastatina de alta pureza (figura 2). Para la determinación de la concentración de simvastatina purificada, realizamos una curva de calibración de simvastatina comercial con un 98% de pureza por HPLC, en la que se midió el área bajo la curva de cada uno de los cromatogramas, en correspondencia con cada una de las concentraciones evaluadas. La masa de simvastatina purificada corresponde con un 73 % de recobrado de la misma.

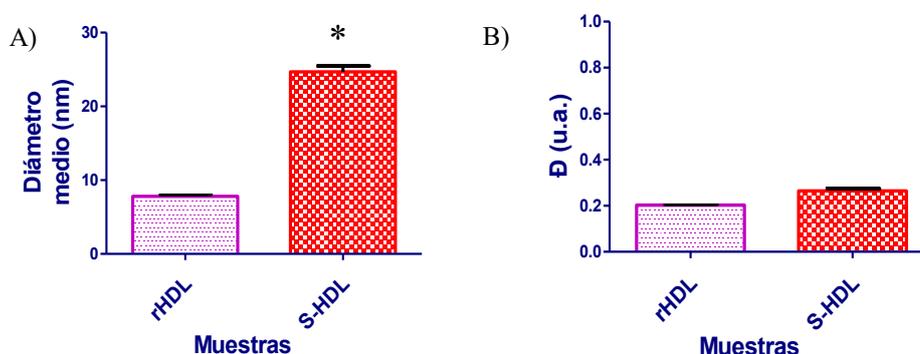


Figura 3. Parámetros físico-químicos de las HDL en presencia o ausencia de simvastatina. A) Diámetro medio de las nanopartículas de HDL. B) Índice de dispersidad de las nanopartículas de HDL. Se muestran datos de 3 réplicas del experimento, las barras negras corresponden a la desviación estándar. * $P < 0,05$.

Aspectos físico-químicos de HDL cargadas o no con Simvastatina

El diámetro medio de las partículas y el índice de dispersidad de las HDL en presencia o ausencia de simvastatina se determinaron por DLS. La incorporación de simvastatina a las nanopartículas propicia un aumento del tamaño de $7,8 \pm 0,3$ nm en las rHDL a 25 ± 2 nm en las S-HDL (figura 3 A) sin una diferencia significativa del índice de dispersidad, con valores de $0,21 \pm 0,01$ para las rHDL y $0,26 \pm 0,02$ para las S-HDL (figura 3 B).

Interacción de HDL con macrófagos

Con el objetivo de evaluar si las nanopartículas cargadas con simvastatina eran capaces de interactuar con células mieloides, evaluamos la presencia de las nanopartículas en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) posterior al tratamiento de estos con DiR-S-HDL a diferentes concentraciones, empleando el fluoróforo DiR como señal mediante citometría de flujo (figura 4). Los macrófagos tratados con cada una de las concentraciones, $0,1 \mu\text{M}$ (figura 4 B), $1 \mu\text{M}$ (figura 4 C) y $10 \mu\text{M}$ (figura 4 D), mostraron presencia del fluoróforo en su superficie celular. Esta presencia no fue prácticamente variable entre las

concentraciones de 0,1 y 1 μM , pero sí se observa una mayor cantidad de fluoróforo presente en las células que estuvieron en presencia de 10 μM de DiR-S-HDL.

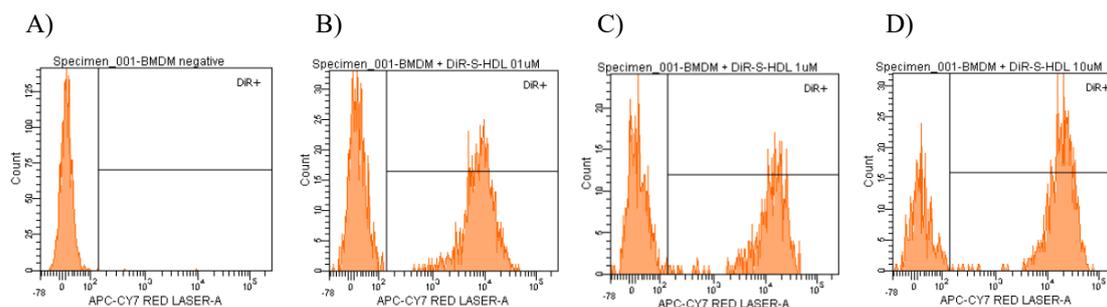


Figura 4. Reconocimiento de BMDM por DiR-S-HDL. A) Células control no tratadas con DiR-S-HDL. B) BMDM tratadas con 0,1 μM de DiR-S-HDL. C) BMDM tratadas con 1 μM de DiR-S-HDL. D) BMDM tratadas con 10 μM de DiR-S-HDL.

Reconocimiento de S-HDL por poblaciones celulares en médula ósea

La especificidad de reconocimiento de las S-HDL en células de médula ósea se evaluó *in vivo*, analizando la presencia de DiR-S-HDL en las diferentes poblaciones celulares presentes en la médula de un ratón hembra apo E-KO de 14 semanas de edad en dieta normal, 24 horas después del tratamiento con las nanopartículas. El fluoróforo DiR se empleó como señal del reconocimiento al evaluar las poblaciones celulares mediante citometría de flujo (figura 5). Las células mieloides (Myelo) (figura 5 C) y dentro de ellas células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*) (figura 5 D), macrófagos (Mo) (figura 5 E) y monocitos (figura 5F), mostraron presencia del fluoróforo en su superficie celular, a diferencia de las demás poblaciones celulares presentes en la médula (figura 5 A y 5 B).

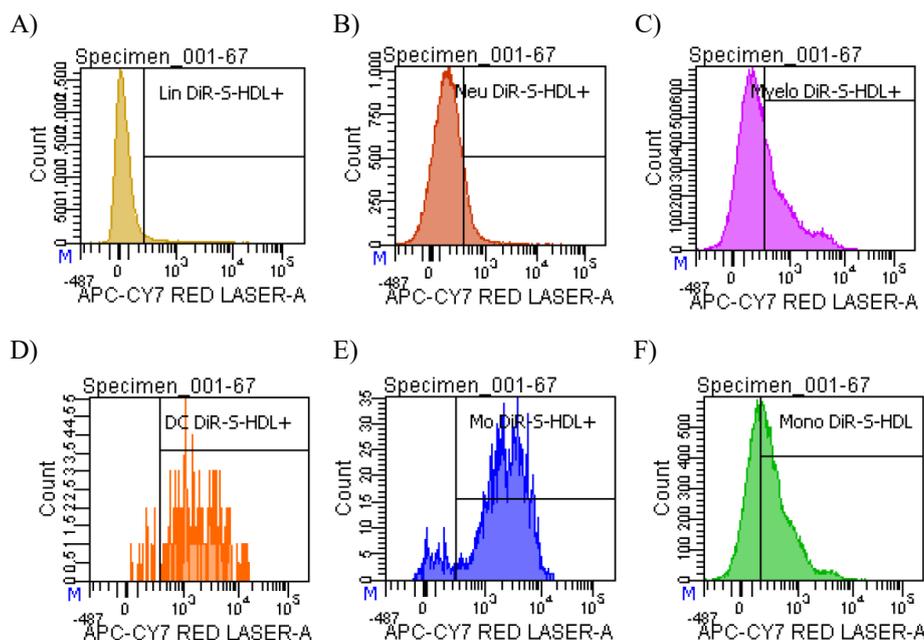


Figura 5. Reconocimiento de poblaciones celulares por DiR-S-HDL *in vivo*. Se muestran las poblaciones celulares de médula ósea de un ratón hembra apo E-KO de 14 semanas de edad en dieta normal sacrificado 24 horas después de tratamiento con DiR-S-HDL A) Células linaje (NK, linfocitos B y T, Eritrocitos y Granulocitos). B) Neutrófilos. C) Células mieloides. D) Células Dendríticas. E) Macrófagos. F) Monocitos.

Discusión

En el presente trabajo se ha evaluado las HDL como vehículo para entrega selectiva de fármacos para el potencial tratamiento de la aterosclerosis. Para la obtención de las HDL el primer paso fue la purificación de apo A-I de HDL de plasma humano. Apo A-I es una proteína helicoidal anfipática con caras tanto polares como apolares a lo largo de su eje, lo que permite su función como estabilizador estructural de las HDL [29]. El proceso de purificación comprendió la deslipidación con disolventes orgánicos de las HDL de plasma humano, obtenidas comercialmente, conduciendo a la precipitación de la proteína pobre en lípidos, con un posterior proceso de renaturalización y diálisis que permitió la obtención de una proteína altamente pura como se puede observar tanto por cromatografía de exclusión molecular como por electroforesis en geles de poliácridamida en condiciones reductoras y no reductoras. El perfil

cromatográfico de apo A-I purificado presentado en la figura 1 A, muestra un único pico bien definido a los 23,5 minutos, correspondiente al tiempo de elución de la proteína. Esto se corroboró mediante la evaluación de los 2 lotes obtenidos de apo A-I purificada por SDS-PAGE. Como se observa en la figura 1 B y C, ambos lotes de proteína obtenida tanto en condiciones reductoras (figura 1 B) como no reductoras (figura 1 C), presentan una banda mayoritaria correspondiente a 28 kDa, peso molecular de apo A-I [29], y que se comprueba con la banda del mismo peso en los carriles 2 y 3 de ambos geles en los que se añadió apo A-I comercial con un 95 % de pureza en su concentración inicial y diluida 1:2 (v:v) en PBS 1x respectivamente. Por otra parte, uno de los principales contaminantes en el proceso de purificación de apo A-I lo constituye la presencia de albúmina en las muestras de la lipoproteína [35]. Sin embargo, en nuestro caso, al comparar con la banda de 66 kDa correspondiente al peso de la albúmina (carriles 8 y 9 de ambos geles), esta banda está ausente en ambos carriles de los 2 lotes de la proteína purificada (carriles 4-7 en ambos geles), así como la ausencia de un pico correspondiente para esta proteína en el cromatograma de la figura 1 A, lo que ratifica la pureza de la proteína obtenida. Es de importancia señalar que aún y cuando la cantidad de apo A-I obtenida por este método es suficiente para nuestros experimentos, el método de obtención es muy largo, requiere gran cantidad de HDL, la cual es obtenida de grandes volúmenes de plasma sanguíneo, y además está sujeta a pérdidas de proteína debidas a la desnaturalización [36, 37], lo que representa una desventaja significativa. En este sentido, otra alternativa de producción de apo A-I comprendería su expresión empleando DNA recombinante en *E. coli* o células de mamífero, aunque esta alternativa también presenta sus desafíos ya que la purificación de la proteína recombinante es difícil y los rendimientos son generalmente bajos [29].

La formulación de las HDL tanto en presencia como ausencia de simvastatina se realizó mediante la hidratación de un film lipídico y posterior sonicación. Las rHDL, con la única adición de DMPC y proteína apo A-I, recrean a las HDL naturales. Sin embargo, se ha visto que la incorporación de drogas hidrofóbicas de bajo peso molecular como la simvastatina propicia la inestabilidad de la estructura discoidal de las rHDL [21] por lo que es necesario el empleo de emulsificadores como MHPC.

Uno de los primeros pasos en la caracterización de las HDL fue evaluar cuánto de la carga adicionada (simvastatina) era capaz de retenerse en las S-HDL durante todo el proceso de síntesis de las nanopartículas. Esto requirió la extracción de simvastatina de las S-HDL una vez preparadas, obteniendo como se observa en la figura 2 un único pico bien definido a los 4,2 minutos, dando una medida de la alta pureza de la simvastatina obtenida. El análisis de la concentración arrojó un 73% de recobrado, lo que está de acuerdo con valores reportados por Binderup y colaboradores en 2019. La pérdida de un 27 % de la simvastatina adicionada en la preparación puede estar asociada a la no incorporación de esta a la bicapa de fosfolípidos que se forma al inicio del proceso de las HDL y que una vez realizada la centrifugación posterior a la sonicación de la mezcla de HDL la simvastatina no integrada sedimenta. Esto podría solucionarse variando la relación Sim:Fosfolípido presente en las formulaciones. Además, otro factor de pérdida en el proceso lo constituye la concentración de las nanopartículas al final de su producción. La pérdida de simvastatina por adherencia al filtro es también un factor que resta al total presente en las formulaciones analizadas al final del proceso. Otros autores como Meiqing Feng y colaboradores han obtenido mayores valores de retención para compuestos como el palmitato de aciclovir, un ácido graso, con 97 % de retención en las HDL con el empleo de una relación 1:20 (m:m) palmitato de aciclovir:fosfolípido (fosfatidilcolina) [38], mientras otros como Yazhe Wang y colaboradores obtuvieron un 62,8 % para el verde de indocianina, en HDL compuestas de fosfatidilcolina, colesterol y ésteres de colesterol [39]; por lo que es necesario tener en cuenta la composición lipídica de las formulaciones, así como la compatibilidad química de los compuestos cargados, para garantizar una mayor o menor retención de la carga de la HDL. No obstante, los valores de retención obtenidos en nuestras S-HDL exhiben suficiente capacidad de carga útil que es fundamental para aplicación clínica de este sistema de administración de fármacos.

La caracterización físico-química de las formulaciones es imprescindible para comprobar la calidad de las mismas [40]. Este proceso conlleva la medición de parámetros característicos como son el tamaño promedio de las partículas y el índice de dispersidad [41]. Las formulaciones rHDL presentaron un diámetro medio de $7,8 \pm 0,3$ nm mientras que las S-HDL presentaron 25 ± 2 nm (figura 3 A). Esta diferencia significativa del diámetro medio se debe al hecho de que la simvastatina se encapsula en el núcleo hidrofóbico de las HDL, variando la estructura discoidal de las rHDL a esférica [29]. Raphael Duivenvoorden y colaboradores reportaron valores de 10,5 nm para rHDL y 26 nm para S-HDL [21] con igual composición lipídica que la empleada en el presente trabajo, y se han observado HDL esféricas con un rango de tamaño entre 20 a 30 nm generadas con la inclusión de otros compuestos en las rHDL tales como triacilglicéridos [25]. No obstante, como se observa en la figura 3 B, esta variación en el tamaño no provoca cambios en cuando al índice de dispersidad de las formulaciones. Este índice es usado para describir el grado de heterogeneidad de la distribución de tamaño de las partículas [41]. Ambas formulaciones rHDL y S-HDL mostraron valores de dispersidad en el intervalo de 0,2-0,3 (Figura 3 B), lo que permite catalogarlas como moderadamente polidispersas [40]. Este resultado sugiere que las nanopartículas obtenidas por esta metodología no presentan una heterogeneidad elevada en su

distribución de tamaño, lo que no debe influir notablemente en su capacidad como vehículo de administración de fármacos.

Una de las primeras aproximaciones de la efectividad de las S-HDL en el tratamiento de la aterosclerosis fue evaluar la capacidad de las HDL de interactuar con los macrófagos, población celular diana en el tratamiento de la placa aterosclerótica [42]. La captación de DiR-S-HDL fue mayor a altas concentraciones (10 μM de DiR-S-HDL, figura 4 D), mientras que no se observan diferencias a concentraciones menores como 0,1 μM (figura 4 B) y 1 μM (figura 4 C). En las HDL naturales la interacción con los macrófagos está mediada por el receptor *scavenger* B1 a los que se unen las HDL [43] o los transportadores con casete de unión a ATP, ABCA1 y ABCG1, que forman complejos con apo A-I y con las HDL maduras respectivamente [44]. Posiblemente, estos mismos receptores estén interactuando con las S-HDL facilitando la unión de nuestras nanopartículas a los BMDM. Otros estudios han señalado que en efecto las S-HDL presentan efectos antiateroscleróticos en la placa [21, 45], lo cual es una medida de la interacción existente entre estas nanopartículas y los macrófagos presentes en la placa. La no diferencia en cuanto a la interacción entre DiR-S-HDL con concentraciones de 0,1 μM y 1 μM y los BMDM pudiera deberse a que DiR-S-HDL presente un comportamiento como agonista de los receptores previamente descritos de los BMDM. Este comportamiento explicaría que a bajas concentraciones el número de receptores activados y de interacciones presentes sean similares, lo que ha de traducirse en un efecto dosis-respuesta similar. Sin embargo, este comportamiento varía a concentraciones más altas (10 μM) donde el número de receptores activados es mayor y por consecuencia la cantidad de fluoróforo que es captada en la superficie de las células como una medida del aumento de las interacciones entre el ligando y el receptor también sea mayor.

Por otra parte, se evaluó la especificidad de reconocimiento de las S-HDL por las poblaciones celulares presentes en médula ósea. Como se observa en la figura 5, S-HDL es captado selectivamente por células mieloides (figura 5 C), y dentro de estas, por células dendríticas (figura 5 D), macrófagos (figura 5 E) y monocitos (figura 5 F). Esto no ocurrió así para las demás poblaciones celulares presentes en la médula (figura 5 A y B). Este comportamiento lo presentaron también HDL en aortas de animales apo E-KO con dietas elevadas en grasa [29, 30], lo cual ratifica la especificidad de nuestras nanopartículas por células mieloides. Este hallazgo también sugiere que la adición de simvastatina en las HDL no afecta la capacidad de estas para interactuar con los macrófagos en la placa aterosclerótica [30].

Conclusiones

En el presente estudio mostramos que apo A-I puede ser extraída eficientemente de las HDL como fuente natural de la misma, aunque este proceso pueda, en cierta manera, presentar numerosas desventajas. Demostramos que las S-HDL permanecen con suficiente capacidad de carga útil en el proceso de obtención de estas, y que la presencia de simvastatina en las HDL provoca el aumento del tamaño de las nanopartículas sin variación de la dispersidad de las mismas. Además, demostramos que las S-HDL reconocen *in vitro* los macrófagos derivados de médula ósea y que este reconocimiento es mayor a elevadas concentraciones de las nanopartículas. Mostramos que este reconocimiento a los macrófagos se mantiene *in vivo* y que además las HDL reconocen otras células mieloides como células dendríticas y monocitos. Los resultados obtenidos sugieren que las HDL pudiesen ser un vehículo para la entrega selectiva de fármacos como la simvastatina a macrófagos en la placa aterosclerótica como potencial tratamiento para la aterosclerosis.

Bibliografía

1. Andersson, J., Libby, P. and Hansson, G.K. (2010). Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clinical Immunology*, 134(1): 33-46.
2. Yun-Guo, L., Jia-Li, Y., Yan-Qing, J., et al. (2020). Black mulberry ethanol extract attenuates atherosclerosis-related inflammatory factors and downregulates PPAR γ and CD36 genes in experimental atherosclerotic rats. *Food and Function*, 11: 2997-3005.
3. Taleb, S. (2016). Inflammation in atherosclerosis. *Archives of cardiovascular diseases*, 109(12): 708-715.
4. Badimon, L. and Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine*, 276(6): 618-632
5. Guerra, Y. (2007). Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 38(1): 3-11.
6. Davis, N.E. (2005). Atherosclerosis-an inflammatory process. *Journal of Insurance Medicine*, 37(1): 72-75.
7. Gimbrone Jr., M.A. and Garcia-Cardena, G. (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology*, 22(1): 9-15.
8. Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 20963-20966.

9. Mestas, J. and Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18(6): 228-232.
10. Johnson, J.L. and Newby, A.C. (2009). Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Current Opinion in Lipidology*, 20(5): 370-378.
11. Garrido-Urbani, S., Meguenani, M., Montecucco, F., et al. (2014). Immunological aspects of atherosclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 36(1): 73-91.
12. Subramanian, M. and Tabas, I. (2014). Dendritic cells in atherosclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 36(1): 93-102.
13. Fava, C. and Montagnana, M. (2018). Atherosclerosis is an inflammatory disease which lacks a common anti-inflammatory therapy: how human genetics can help to this issue. A narrative review. *Frontiers in pharmacology*, 9: 55.
14. Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., et al. (2014). Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation Research*, 114: 1852-1866.
15. Dweck, M.R., Doris, M.K., Motwani, M., et al. (2016). Imaging of coronary atherosclerosis - evolution towards new treatment strategies. *Nature Reviews Cardiology*, 13(9): 533.
16. Williams, K.J., Feig, J.E. and Fisher, E.A. (2008). Rapid regression of atherosclerosis: insights from the clinical and experimental literature. *Natural Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5(2): 91-102.
17. Klein L.W. (2007). Atherosclerosis regression, vascular remodeling, and plaque stabilization. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(2): 271-273.
18. Kanshana, J.S., Khanna, V., Singh, V., et al. (2017). Progression and Characterization of the Accelerated Atherosclerosis in Iliac Artery of New Zealand White Rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 69 (5): 314-325.
19. Goyal, I., Ghanim, H., Hejna, J., et al. (2020). SUN-560 Simvastatin Inhibits the Pro-Inflammatory and Pro-Atherogenic Effects of Cream in Obese Subjects. *Journal of the Endocrine Society*, 4(Suppl 1): SUN-560.
20. Chrispin, J., Martin, S.S., Hasan, R.K., et al. (2013). Landmark lipid-lowering trials in the primary prevention of cardiovascular disease. *Clinical Cardiology*, 36(9): 516-523.
21. Duivenvoorden, R., Tang, J., Cormode, D. P., et al. (2014). A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature communications*, 5(1): 1-12.
22. Bird, L. (2019). Targeting trained immunity. *Nature Reviews Immunology*, 19: 2-3.
23. Alaargm A., Pérez-Medina, C., Metselaar, J.M., et al. (2017). Applying nanomedicine in maladaptive inflammation and angiogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 119: 143-158.
24. Binderup, T., Duivenvoorden, R., Fay, F., et al. (2019). Imaging-assisted nanoimmunotherapy for atherosclerosis in multiple species. *Science translational medicine*, 11(506): 7736.
25. Tang, J., Baxter, S., Menon, A., et al. (2016). Immune cell screening of a nanoparticle library improves atherosclerosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44): 6731-6740.
26. Aggarwal, A. and Singh, S. (2011). Newer antiatherosclerosis treatment strategies. *Heart Asia*, 3(1): 26-30.
27. Favari, E., Chroni, A., Tietge, U.J., et al. (2015). Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 224: 181-206.
28. Yvan-Charvet, L., Wang, N. and Tall, A.R. (2010). Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 30: 139-43.
29. Mulder, W.J., van Leent, M.M., Lameijer, M., et al. (2018). High-density lipoprotein nanobiologics for precision medicine. *Accounts of Chemical Research*, 51(1): 127-137.
30. Pérez-Medina, C., Binderup, T., Lobatto, M. E., et al. (2016). *In Vivo* PET Imaging of HDL in Multiple Atherosclerosis Models. *JACC Cardiovascular Imaging*, 9: 950.
31. Tang, J., Baxter, S., Menon, A., et al. (2016). Immune Cell. Screening of a Nanoparticle Library Improves Atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44): 6731-6740.
32. Hammond, J.B. and Kruger, N.J. (1988). The Bradford method for protein quantitation. In *New Protein Techniques*, 3: 25-32.
33. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
34. Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111(1): A3-B.
35. Collier, T., Bystrom, C. and Higgins, A. (2019). Compositions and methods for purification and detection of hdl and apoA1. U.S. Patent Application No 16/208,739, 15 Agosto 2019.
36. Brewer, H.B., Ronan, R., Meng, M., et al. (1986). Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. *Methods in enzymology*, 128: 223-246.
37. Kamalanathan, A.S., Vijayalakshmi, M.A., and Venkataraman, K. (2018). Efficient purification of Apolipoprotein A1 (ApoA1) from plasma by HEA HyperCel™: An alternative approach. *Journal of Chromatography B*, 1073: 104-109.

38. Feng, M., Cai, Q., Huang, H., et al. (2008). Liver targeting and anti-HBV activity of reconstituted HDL–acyclovir palmitate complex. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 68(3): 688-693.
39. Wang, Y., Wang, C., Ding, Y., et al. (2016). Biomimetic HDL nanoparticle mediated tumor targeted delivery of indocyanine green for enhanced photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148: 533-540.
40. Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not? *Journal of controlled release*, 235: 337-351.
41. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., et al. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2): 57.
42. Martinet, W., Coornaert, I., Puylaert, P., et al. (2019). Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis. *Frontiers in pharmacology*, 10: 306.
43. De Villiers, W.J. and Smart, E. J. (1999). Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *Journal of leukocyte biology*, 66(5): 740-746.
44. Jeong, S.J., Lee, M.N., and Oh, G.T. (2017). The role of macrophage lipophagy in reverse cholesterol transport. *Endocrinology and Metabolism*, 32(1): 41-46.
45. Wang, K., Yu, C., Liu, Y., et al. (2018). Enhanced antiatherosclerotic efficacy of statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein via ganglioside GM1 modification. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(3): 952-962.